

## 菜粉蝶微孢子虫核糖体 RNA (rRNA) 编码基因的研究\*

王见杨 黄可威

(中国农业科学院蚕业研究所 镇江 212018)

陆长德

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

**摘 要:**用 PCR 方法扩增、克隆了菜粉蝶微孢子虫核糖体小亚单位 RNA (SSUrRNA) 编码基因的核心序列 1205bp 后,进一步克隆到菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因 3' 端至 LSUrRNA 基因 5' 端(580R 区)657bp 长的序列。与 GenBank 中对应序列比较后,在 657bp 这段序列鉴定出菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因 3' 末端、rRNA 基因内转录间隔区(ITS)及 LSUrRNA 基因 5' 端(580R 区),它们分别位于该序列中 145 位、146-186 位及 187 位。与 SSUrRNA 基因核心序列拼接后 SSUrRNA 全基因长为 1245bp, rRNA 基因内转录间隔区为 41bp 及核糖体大亚单位 RNA (LSUrRNA) 编码基因 580R 区为 470bp。同时还构建了菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 的完整二级结构。关于微孢子虫 rRNA 基因的克隆及 SSUrRNA 的二级结构在国内尚属首次报道,它为进一步利用核糖体 RNA 编码基因及 SSUrRNA 的二级结构对不同微孢子虫的分类及亲缘关系的确定奠定了基础。

**关键词:** PCR, 核糖体 RNA (rRNA) 编码基因, 580R 区

**中图分类号:** Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0598-07

微孢子虫 (*Microsporidium*) 是普遍分布于自然界的细胞内专性原虫类寄生物,有极为广泛的寄主,包括脊椎动物和无脊椎运动,是经济昆虫、鱼类、兔类、产毛动物、啮齿类及灵长类的致命病原<sup>[1]</sup>。近年来,人们发现在免疫缺陷患者体内微孢子虫是重要的肠道致病病原<sup>[2]</sup>,并可引起多种炎症如心肌炎等,由此在生物学和医学上“微孢子虫”已引起了人们的广泛关注<sup>[3]</sup>。由微孢子虫类寄生于经济昆虫家蚕 (*Bombyx mori*) 而引起的毁灭性疫病——家蚕微粒子病,一直被养蚕国家和地区列为蚕业生产的检疫对象。

家蚕微粒子病除由家蚕微孢子虫 (*Nosema bombycis*) 感染引起外,还有许多是由野外昆虫的微孢子虫的交叉感染而引起的<sup>[4]</sup>。我们从菜粉蝶 (*Pieris rapae* L.) 中分离到的微孢子虫(暂定代号:MP<sub>r</sub>)即可感染家蚕使其发病,属家蚕病原性微孢子虫,并具有胚种传染性。但并非所有家蚕病原性微孢子虫均具有胚种传染性<sup>[5]</sup>。微孢子虫相互交叉感染的存在和胚种传染的不确定性,使得微孢子虫诊断技术的改进显得尤为迫切。这种诊断从某种意义上就是对其进行分类,即从不同水平上对不同微孢子虫的亲缘关系的确定,鉴定出对家蚕具有感染性、胚种传染性的种、属,从而为蚕桑生产减少损失。

目前微孢子虫分类的主要依据是其生活史和超微结构。随着分子生物学的发展,从基因水平、分子水平上对原虫类寄生物的分类、亲缘关系的确定的报道日益增多,最为常

\* 国家“九五”(96-616-02-03)及江苏省“九五”(BE96369-1)科技攻关课题

作者简介:王见杨(1971-),女,助研,湖北麻城人,研究生,主要从事蚕病理学研究。

收稿日期:2000-09-18,修回日期:2001-02-12

见的是利用 SSUrRNA 的序列及其编码基因,其它如利用 rRNA 基因的间隔区、LSUrRNA 基因的 580R 区及 SSUrRNA 至 LSurRNA 基因的中间部分序列来探讨不同原虫类的亲缘关系也有报道,这些都极大地促进了分类学的发展<sup>[6-7]</sup>。为了给菜粉蝶微孢子虫等不同家蚕病原性微孢子虫的分类及亲缘关系的确定提供分子水平上的可靠依据,本文对菜粉蝶微孢子虫的 rRNA 基因进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菜粉蝶微孢子虫(MPr)由本室从野外昆虫菜粉蝶中分离后在家蚕中继代繁殖。继代用及对照用家蚕品种均为 75 新×7532。菌种 *E. coli* DH12S 由中国科学院上海生物化学研究所 219 组保存。质粒 pTZ19R 购自 Pharmacia 公司,pGEM<sup>+</sup>-T 载体购自 Promega 公司,限制性内切酶购自 TaKaRa 公司,DNAzol<sup>TM</sup>抽提试剂盒购自 GIBCO-BRL 公司,RNaseA 购自华美公司,蛋白酶 K 购自 Merck 公司,溶菌酶购自上海东风生化试剂厂。仪器主要有美国 Beckman 公司 1000M 寡核苷酸合成仪、pH 计及 Avanti<sup>TM</sup>J-25 高速冷冻离心机,美国 Perkin-Elmer 公司 PCR 扩增仪,Pharmacia 公司 RNA/DNA 计量仪,LI-COR 4200 DNA 测序仪。

### 1.2 方法

**1.2.1 家蚕基因组 DNA 的提取:**用家蚕后部丝腺适量,放入研钵加入液氮反复研磨,再加入适量 DNA 抽提液 DNAzol<sup>TM</sup>,继续研磨,再按常规酚/氯仿方法抽提。

**1.2.2 菜粉蝶微孢子虫的制备纯化及其基因组 DNA 的提取:**按文献[8]的方法进行。

**1.2.3 菜粉蝶微孢子虫核糖体 RNA(rRNA)基因的 PCR 扩增:**SSUrRNA 基因核心序列的 PCR 扩增:用 PileUp 软件分析了 GenBank 中不同种属微孢子虫的 SSUrRNA 基因序列后,在其保守区设计了一对引物 1<sup>\*</sup>和 2<sup>\*</sup>。引物序列为:上游引物 1<sup>\*</sup> 5'-CAC CAG GTT GAT TCT GCC GTA C-3'(22bp),其 5'端对应于多种微孢子虫 SSUrRNA 基因 5'端起始位置,下游引物 2<sup>\*</sup> 5'-GCA ACC ATG TTA CGA CTT ATA TCA GA-3'(26bp),它靠近 SSUrRNA 基因 3'末端。PCR 以应:取 60~80ng 家蚕及菜粉蝶微孢子虫基因组 DNA 为模板,采用 50μL 体系,1<sup>\*</sup>、2<sup>\*</sup>引物的退火温度为 64.7℃,其它均按常规 PCR 反应条件进行。PCR 产物的分析、回收、连接反应与克隆筛选均按常规方法进行。

SSUrRNA 基因核心序列的下游序列的 PCR 扩增:用 SeqLab 软件分析了十几种不同生物(主要是微孢子虫)的 SSUrRNA 基因及核糖体大亚单位 RNA(LSurRNA)基因的高度保守区,以 GenBank 中仅有的一条微孢子虫 rRNA 基因全序列(即蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* 的 rRNA 全基因<sup>[9]</sup>,近 4000bp)为模板设计合成了一对引物 3<sup>\*</sup>、4<sup>\*</sup>。引物 3<sup>\*</sup>(5'-TCT TTG TAC ACA CCG CCC-3',18bp)位于引物 2<sup>\*</sup>的上游,但也位于 SSUrRNA 基因的 3'端,引物 4<sup>\*</sup>(5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3',19bp)位于 LSurRNA 基因的 5'端的 580R(编号对应于大肠杆菌)。PCR 反应等同上。

**1.2.4 寡核苷酸引物 3<sup>\*</sup>、4<sup>\*</sup>的放射性标记:**通过 T4 噬菌体多核苷酸激酶催化的磷酸化反应标记合成的寡核苷酸,标记体系:在两个 0.5mL Eppendorf 管中分别加入引物 3<sup>\*</sup>、4<sup>\*</sup>(20pmol/μL)1μL,10×T4 噬菌体多核苷酸激酶缓冲液 1μL,T4 噬菌体多核苷酸激酶 1μL(8U),[γ-<sup>32</sup>P]dATP1μL,混匀,37℃水浴 1h 后 68℃水浴 10min。放射性标记的寡核苷酸的

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳按参考文献[10]的方法进行。

**1.2.5 阳性重组质粒中外源片段的荧光双脱氧测序:**由中国科学院上海生物工程中心协助完成(重组质粒的酶切鉴定图略)。

**1.2.6 SSUrRNA 二级结构的构建:**参照欧洲 rRNA 数据库中不同种属微孢子虫 SSUrRNA 二级结构的一般模型<sup>[11]</sup>,用 Forcon、RnaViz、DCSE 等生物软件构建了菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 的完整二级结构。

## 2 结果和讨论

微孢子虫是带有原核生物型核糖体的单细胞真核生物,其核糖体大亚基(50S)和小亚基(30S)中分别含有 23S 和 16SrRNA,缺乏一般真核生物所有的 5.8SrRNA。其核糖体 RNA (rRNA)编码基因的图谱见图 1。

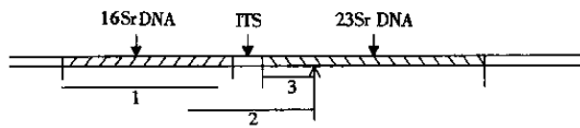


图 1 微孢子虫核糖体 RNA(rRNA)编码基因的图谱

Fig.1 Genetic map of the small (16S) and large (23S) subunit rDNA with the internal transcribed region (ITS)

1. The clones numbered 1 ~ 2 were obtained by PCR amplification with primers 1<sup>#</sup>/2<sup>#</sup>, 3<sup>#</sup>/4<sup>#</sup> respectively; 3. The region numbered 3 is 580R region.

500、400、300 和 200bp)。

### 2.1 菜粉蝶微孢子虫核糖体 RNA(rRNA)基因的 PCR 扩增

菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列的 PCR 扩增结果见图 2。用引物 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>对菜粉蝶微孢子虫基因组 DNA 进行 PCR 扩增时,得到明显的扩增条带,大小在 1.2kb 左右。SSUrRNA 基因核心序列的下游序列的 PCR 扩增结果见图 3。图 3 中 3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>这对引物扩增出约 4 条带,其中 650bp 左右长的带明显比其它条带亮而宽(图 3 中 100bp DNA Ladder 分别为:1500、1000、900、800、700、600、

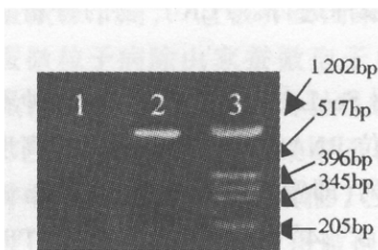


图 2 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列的扩增结果

Fig.2 Amplification of the core region of SSUrRNA gene of MPr

1. 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>/genomic DNA of *Bombyx mori*;  
2. 1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>/genomic DNA of MPr;  
3. Marker: pTZ19/*Hin*II.

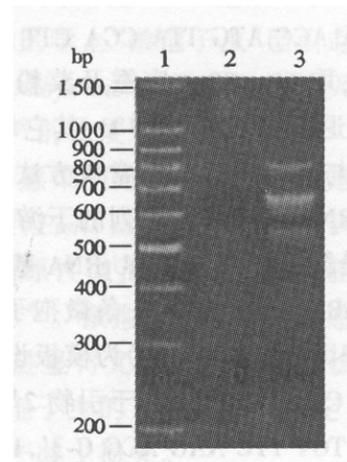


图 3 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列下游序列的扩增结果

Fig.3 Amplification of the downstream of SSUrRNA gene of MPr  
1. 100bp DNA Ladder; 2. 3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>/genomic DNA of *Bombyx mori*; 3. 3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>/genomic DNA of MPr.

由图 2、3 可知,1<sup>#</sup>、2<sup>#</sup>和 3<sup>#</sup>、4<sup>#</sup>这两对引物对家蚕基因组 DNA 均没有明显的扩增产物。这一方面确证了从菜粉蝶微孢子虫基因组 DNA 中所扩增的产物不是从家蚕基因组 DNA 中扩增而来,即不存在两种基因组 DNA 相互污染的可能。另一方面表明了家蚕 SSUrRNA 基因与菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因同源性很低,这可能与家蚕 SSUrRNA 基因为真核生物型而微孢子虫类 SSUrRNA 基因为原核生物型有关。

## 2.2 克隆片段的荧光双脱氧测序结果

**2.2.1 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列的测序结果:**用 Clone 软件将正反向所测得的菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列进行拼接后,结果见图 4。图 4 中下划线处序列分别表示引物 1<sup>#</sup>、3<sup>#</sup>及引物 2<sup>#</sup>的序列。

```
CACCAGGTTGATTCTGCGCTGACGTAGACGCTATACTCTAAGATTAACCCATGCATGTTTATTGAATATAAAGAAAAGACGAAC
AGCTCAGTAACTCTTATTTGATCTGATGTATTAGGATTATAACTATGTTAAATATATAGGTAACAATAATACAATAAGAATGA
GATCTATCAGTTAGTTGTTAAAGGTAATGGCTTAACAAGACTATGACGGATAACGGTATTACTTTGTAATATCCGGAGAAGGA
GCCTGAGAGATTGCTACTAAGTCTAAGGATTGCAGCAGGGGGCGAAACTTGACCTATGATATTAATTTGAGGCAGTTATGAGT
AGTATTTTTTAATTATTTGATGATTTGTAAGTACATATTACAAGATAAATCGGAGGGCAAATCGAGTCCACAGCCGCGGTAA
TACTTGTCCGATAGTGTGTATGATGATTGATGCAGTTAAAAAGTCTGTAGTTTATTTATAATAAGCATTTGTAAGGTATACT
GTATGGTTAGGAGAGAGATGAAATGTGATAACCCCTAAGTGAACAGAAAGCGAAGCTGTTATACTTAAATGTATTATTAG
AACAGGACGTAAGCTAGAGGATCGAAGATGATTAGATACCATTGTAGTTCTAGCAGTAAACTATGTTGAATCATAGATATA
TTTTGATATATTTTATGTAGAGAAAATTAAGATTATATTGACTCTGGGGATAGTATGATCGCAAGATTGAAAATTAAGAAT
TGACGGAAGAATACCACAAGGAGTGGATTGTCCGGCTTAATTTGACTCAACCGGGGTAATTTACCAGGTATAACATGGTAT
AATATTTTATCATGATAGTGGTGCATTGCCGTTTCCAATGGATGCTGTGAAGTAAATGATTAATTTCAACAAGATGTGAAACCC
TCATTTAGACGGATGTAGTATACATATGAAGGAGAGGATTAACAACAGGTCGGTTATGCCCTAAGATAATCTGGGTTGCACC
CGCAATACAGTAAATTTGATATTATAAGGGATAATAATATGTAAGATATATTTGATCATGGAATTGCTAGTAAATTTTATTT
AATAAGTAGAATTTGAATGAGTCCCTGTTCTTTGTACACACCGCCGTCGCTATCTAAGATGGTATTATCTATGAACAAATTT
ATAAAGTGAATAGATAGTACTAGATCTGATATAAGTCGTAACATGCTTGGC
```

图 4 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列(1205bp)

Fig.4 The core region sequence of SSUrRNA gene of MPr

**2.2.2 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列下游序列的测序结果:**所测菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列下游序列见图 5。测得序列长度为 657bp,与估计长度相符。图中下划线处序列分别表示引物 3<sup>#</sup>的序列、菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因的 3'端、菜粉蝶微孢子虫 LSUrRNA 基因的 5'端及引物 4<sup>#</sup>的序列。

```
TCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTATCTAAGATGGATGTTGATATGAAATGCTGCTTGAATGTGAGGACTTGAGTATTAAC
AACTAGATAAGATATAAGTCGTAACAAGGCTGCTATAGAAGAATCTGTGGCAGGWTCAATAAAGATATATTAATAATAAGTA
AGATGAAGTGTGGTAAGGGATCTCTTGGGTTCTGTACAGGAAAGGACGTAGACGAATGCGATAAGGGGAGCCCTCATCTCAG
TTTAGTCCATTTCCGAATGAAAGAATACTCCTAGAACTTAAGCAATATCATATTAGGAAGGAATAGAAATTAACGAAGATTCT
CACAGTAGTGGCGAATGAACAGAGATAAGTCCACGATGGTAAACTGTATCCAATACGGTGTGTATGTAATATTTAGAAATGA
TAAGCTGAAAAGCTAGACCATAGCGGGTTATAGTCCCTCCATCTATTGAGATTATGAGATTAGCCTTGCTTGGTAAATGCAAG
GTGAATTTGGTGGTATAGTCGCATCCAACACTAAATATAACAGAACACCGATAGCGAAGAAGTACTGCGAAGGAAAGAAGAAAG
GTCTTTTCAGACCAATAAAGTAGTAAAATTACCAACACGGAAGGCAATTTATTGCACCCGCTCTGAAACACGGACC
```

图 5 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列下游序列(657bp)\*

Fig.5 The downstream of SSUrRNA gene core region of MPr

\* 本文两条序列均已被美国 GenBank 数据库收录,登录号:AF240354,AF240356。

将其与 2.2.1 所测得的菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列 1205bp 长的序列(图 4)进行比较后,发现图 5 的 1~35bp 与 1.2kb 的 1105~1135bp 处完全相同。从 1.2kb 的 1136 位开始,两者有所不同。但 1.2kb 的最后 22bp[即引物 2\* 3'端的 22bp]又与本序列相同。从 1.2kb 的 1136 位到引物 2\* 之前的这段不完全相同的序列中,本序列比其相应区段长 11bp。

对于同一种微孢子虫的 rRNA 基因 3'端的序列有变异的情况, Gatehouse 亦曾发现过<sup>[9]</sup>。Gatehouse 在对蜜蜂微孢子虫(*Nosema apis*)的核糖体大亚单位 LSUrRNA 基因的 3'端进行 PCR 扩增时,出现了多个产物,它们大小不一,他选取了其中的 1.25kb 和 1.35kb 两条带进行了测序(1.35kb 的条带只从一个方向测)。结果显示两条序列亦不完全相同,1.35kb 的序列从不同点(divergent point)开始不确定碱基(ambiguous base)增多。

菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列的下游序列的 PCR 扩增结果亦与 Gatehouse 类似。在对合成的寡核苷酸引物 3\*、4\* 进行同位素标记鉴定后,两条引物未发生降解,长度相符(图略),从而排除了是由引物的降解引起的产物多样性。本次 PCR 扩增产物共有 4 条带,虽然大小相差不大,但产物量相差甚远。而测序所选的 650bp 左右的扩增产物其带型较宽,估计非一条带组成。

Gatehouse 认为这种情况的发生,一方面由于基因(这里指 rRNA 基因)多相性(heterogeneity),另一方面可能是基因重复序列的存在(rRNA 基因为中度重复序列)。

### 2.3 SSUrRNA 基因 3'端的鉴定

因 GenBank 中至今未收录其它地理株系的菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因序列,故将本序列(657bp)与 Gatehouse 的蜜蜂微孢子虫 *Nosema apis* (U97150)及 *Nosema algerae* (AF069063)的 SSUrRNA 基因进行比较来鉴定 SSUrRNA 基因 3'端。比较后认为菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因的 3'端位于本序列的 145 位。其 3'端序列与 *Nosema algerae* 的同源性较高,其中 3'端结尾处 10bp 长的序列与 Gatehouse 的 *Nosema apis* 的完全相同。Gatehouse 在比较了 *Nosema* 属和 *Vairimorpha* 属不同种的 SSUrRNA 基因 3'端的高度保守区后确定了 *Nosema apis* SSUrRNA 基因 3'端。与 2.2.1 中图 4 的 SSUrRNA 基因核心序列(1205bp)拼接后得到 SSUrRNA 全基因长为 1245bp。

### 2.4 菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 的二级结构

由菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因全序列 1245bp 构建了 SSUrRNA 的完整二级结构(图略)。该二级结构不仅同样缺乏在其它真核生物 SSUrRNA 二级结构存在而在一般微孢子虫中没有的螺旋 E10-1,11,46,而且也缺乏在一般微孢子虫中出现过的螺旋 10, E23-n, E43。Hatakeyama 测定了五种微孢子虫的 SSUrDNA 序列并构建了它们相应 SSUrDNA 的二级结构模型<sup>[12]</sup>,发现 M11 与 M12 具相同的螺旋结构,但比 SES-NU 多出螺旋 43。在比较了它们的 SSUrDNA 一级结构(长度、GC 含量、相似性等)及相应 SSUrRNA 的二级结构后认为, N.b NIS-M11 应改属于 *Vairimorpha* 属。可见 SSUrRNA 的二级结构及其基因在微孢子虫的分类中均具有重要作用。Pieniazek 测定了 *Nosema trichoplusiae* 的 SSUrDNA 序列(1233bp)<sup>[13]</sup>,发现其与 *N. bombycis* 的 SSUrDNA 序列完全一致,认为它是 *N. bombycis* 的同种异名。Malone 通过比较 14 种微孢子虫的 SSUrDNA 的 V4 可变区后<sup>[14]</sup>,认为他们从菜青虫 *Pieris rapae* 中分离的微孢子虫与 *Vairimorpha* 属关系更近。

## 2.5 与家蚕微孢子虫 SSUrRNA 的二级结构及基因序列的比较

作者亦克隆测序了家蚕微孢子虫(镇江株)的 SSUrRNA 全基因(1233bp),并构建了其二级结构(待发表)。两者的二级结构完全相同,均缺乏在另一家蚕微孢子虫(日本强毒株) *N. bombycis* SES-NU SSUrRNA 二级结构中特有的螺旋 18<sup>[12]</sup>。用 DNA-STAR 软件对两者 SSUrRNA 基因进行了同源分析,两者序列相似值为 98.1%,它比 Hatakeyama 所测 *Nosema* 属的 SES-NU 与 Sd-NU-IW8401 SSUrRNA 基因序列相似值 99.2% 稍低<sup>[12]</sup>。根据家蚕微孢子虫(镇江株)和菜粉蝶微孢子虫两者的 SSUrRNA 二级结构完全相同,两者基因序列同源性高达 98.1% 但略有不同以及生物学研究结果,初步认为它们同属于 *Nosema* 属,为同属不同种。

## 2.6 LSUrRNA 基因 5'端(580R 区)的鉴定

将图 5 中菜粉蝶微孢子虫 SSUrRNA 基因核心序列的下游序列(657bp)与 GenBank 中相近种属如 *Nosema algerae* 的 LSUrRNA 基因 5'端比较后,认为菜粉蝶微孢子虫 LSUrRNA 基因的 5'端位于本序列的 187 位,这样从 LSUrRNA 基因 5'端至保守区(引物 4\* 所在处)(580R 区)共扩增出 470bp 长的序列,比 *Nosema apis* 的 437bp 稍长。同时,rRNA 基因内转录间隔区(ITS)为 41bp,与 *Nosema algerae* 的 ITS 区长度相同,并与 GenBank 中其它一些种属微孢子虫的对应区相近。与 *Nosema apis* 的不同的是,该间隔区的 AT 含量较高,本序列为 75.6%,*Nosema apis* 的为 87.8%,而在某些种属中 TG 含量极高,尤其是 T,但亦无一致性。

在与 GenBank 中相近种属的对应序列比较后发现,在菜粉蝶微孢子虫 rRNA 基因的 SSUrRNA 的 3'端、基因内转录间隔区、LSUrRNA 的 5'端这一段序列中均与 *Nosema algerae* 的相应序列有较高同源性。这也证实了它来自于菜粉蝶微孢子虫 rRNA 基因。

迄今为止有关微孢子虫的分子生物学的研究大部分集中于核糖体 rRNA 的编码基因(rDNA)。rDNA 在基因组中常以多拷贝的串联重复单位存在。每个重复单位是由转录单位和基因间隔区(IGS, Intergenic Spacer)组成,对于大多数的真核生物来说,转录单位模式为:SSUrDNA-ITS1-5.8S-ITS2-LSUrDNA。ITS 即为转录间隔区(Internal transcribed spacer)。Vossbrinck 分离微孢子虫 *Vairimorpha necatrix* 的 RNAs 时,发现其不但有不寻常的原核电泳迁移率,也缺乏 5.8SrDNA,进一步研究表明其 5.8SrDNA 相应序列同原核生物一样,存在于 LSUrDNA 的 5'端,不含有 ITS2 区<sup>[15]</sup>。rRNA 的编码基因(rDNA)基因本身在进化上是高度保守的,但其间隔区却是高度可变的,即使是亲缘关系极为相近的不同种之间<sup>[16-17]</sup>。

**致谢** 本文大部分实验工作是在中国科学院上海生物化学研究所 219 组完成的,感谢毛小红和赵响先生的大力帮助。

## 参 考 文 献

- [1] Weiss L, Vossbrinck C R. *Adv Parasitol*, 1998, 40: 351 ~ 395.
- [2] Gumbo T, Hobbs R E, Carlyn C. *Transplantation*, 1999, 67(3): 482 ~ 484.
- [3] Muller M. *Parasitology Today*, 1997, 13(12): 455 ~ 456.
- [4] 広瀬安春. 蚕丝研究, 1979, 111: 118 ~ 123.
- [5] 藤原公. 日蚕杂, 1984, 49(3): 229 ~ 235.

- [ 6 ] Qari S H, Goldman I F, Pieniazek N J, *et al.* *Gene*, 1994, **150**:43 ~ 49.
- [ 7 ] Vossibrinck C R, Baker M D, Dider E S, *et al.* *J Euk Microbiol*, 1993, **40**(3):354 ~ 362.
- [ 8 ] 王见杨, 黄可威. 蚕业科学, 1999, **25**(3):195 ~ 197.
- [ 9 ] Gatehouse H S, Malone L A. *J Invertebr Pathol*, 1998, **71**:97 ~ 105.
- [ 10 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning-A laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [ 11 ] Van de Peer Y, De Rijk P, Winkelmans T, *et al.* *Nucleic Acids Research*, 2000, **28**:175 ~ 176.
- [ 12 ] Hatakeyama Y, Kawakami Y J, Iwano H, *et al.* *J Serie Sci Jpn*, 1997, **66**(4):242 ~ 252.
- [ 13 ] Pieniazek N J, da Silva A J, Slemenda S B, *et al.* *J Invertebr Pathol*, 1996, **67**(3):316 ~ 317.
- [ 14 ] Malone L A, Melvor C A. *J Invertebr Pathol*, 1996, **68**(3):231 ~ 238.
- [ 15 ] Vossbrink C R, Woese, C R. *Nature*, 1986, **320**(6059):287 ~ 288.
- [ 16 ] Fedoroff N V, *Cell*, 1979, **16**:697 ~ 710.
- [ 17 ] Long E O, David I B. *Annu Rev Biochem*, 1980, **49**:727 ~ 764.

## STUDIES ON THE RIBOSOMAL RNA GENE (rDNA) OF A MICROSPORIDIUM ISOLATED FROM *PIERIS RAPAE* L.

Wang Jianyang Huang Kewei

(*Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China*)

Lu Changde

(*Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*)

**Abstract:** Nuclotide sequence (1205bp) of small subunit ribosomal RNA (SSUrDNA) of a microsporidium isolated from *Pieris rapae* L. (abbr: MPr) was specifically amplified by polymerase chain reaction (PCR). Another fragment of 657bp downstream of MPr SSUrDNA 3' end was amplified with two other primers. Within this 657bp fragment, the putative 3' terminus of MPr SSUrDNA and the extreme 5' of large subunit ribosomal RNA gene (LSUrDNA) were identified, which situated at base 145, 146 ~ 186 and 187, respectively. Then the full sequence of MPr ssurDNA is 1245bp. Its GC content was also nearly 34%. The ITS region (internal transcribed spacer), positioned between the ssu and LSUrRNA genes, was found to be 41bp in length. The LSUrDNA 580r region of MPr is 470bp, longer than 437bp of *Nosema apis*, 447bp of *Nosema algerae*. The secondary structure of MPr SSUrRNA was constructed. These analyses of MPr rRNA gene contributed to the somewhat limited microsporidian taxonomic classification based on morphology.

**Key words:** PCR, rRNA gene, 580R region